

从石蜡包埋和甲醛浸泡组织中提取 DNA 进行 PCR 扩增的研究

孙文东* 邓国仁 李吉友

(北京市肿瘤防治研究所, 北京 100034)

关键词 石蜡包埋组织, 脱蜡, DNA 提取, PCR 扩增

如何从石蜡包埋组织中高质量的提取 DNA 从而进行分子生物学特别是基因工程方面的科研工作, 目前国内尚未见报道。我们采用二甲苯或水浴法对 2 块胃癌石蜡包埋组织进行脱蜡, 并提取、纯化了 DNA, 进行 PCR 扩增, 获得了成功。另外对用甲醛浸泡的组织其 DNA 的受损程度与上述进行了比较, 现报告如下。

材 料 和 方 法

一、标本来源

石蜡包埋的胃癌组织 (2 块) 和经甲醛浸泡的胃癌组织标本 (2 块) 取自本所病理科。石蜡包埋组织病理号分别为 64 和 66 号, 于 1979 年包埋。甲醛浸泡组织 11873 号于 89 年浸泡, 7713 号于 85 年浸泡。以上各取 1g。

二、质粒 pGC 6.6

含癌基因的 c-Ha-ras 质粒 pGC 6.6 为本组从 BGC-823 细胞 DNA 中克隆出的重组质粒^[2]。

三、引物 PC₁ 和 PC₂

PC₁ 和 PC₂ 均为美国 Beckman 公司生产的 200A DNA 合成仪合成的 20 聚脱氧核糖核酸。PC₁ 的序列为自 c-Ha-ras 第 12 位密码突变位点算起正链上游的第 31 至第 50 个核苷酸序列, PC₂ 则为负链的突变位点下游第 31 至第 50 个核苷酸序列, 通过 PCR 可扩增出 100bp 的片段, 可作为 PCR 扩增的阳性对照。

四、工具酶

耐热 Taq DNA 聚合酶为美国 Cetus 公司所赠。

五、各组织标本 DNA 的提取

1. 二甲苯脱蜡法 将 64 号石蜡包埋组织块切成 5—10μm 厚的薄片, 置入带盖的试剂瓶中, 加 20ml 二甲苯, 微微摇动, 换液 3 次 (用纱布罩住口), 总时间大于 12h。用浓度为 100%, 90%, 75%, 50%, 25% 的乙醇呈梯度水化, 每次 20ml, 间隔 30min。用 SSC (3 mol/L NaCl, 0.3 mol/L 柠檬酸钠·2H₂O, H₂O 800

ml, 用 1 mol/L HCl 调 pH 至 7.0, 后加水至 1L, 用时再稀释 20 倍) 浸洗一次 (30 min), 弃上清, 剪碎组织, 加溶液 A 10ml (10ml SSC 液中含 1% SDS 和 100 μg 蛋白酶 K/ml)^[3] 置 37℃ 恒温水浴 3 天。等体积饱和酚萃取一次, 氯仿-异戊醇 (24:1) 萃取两次, 加醋酸钠至 0.3 mol/L, 用两倍体积无水乙醇沉淀 DNA, 离心 12000 r/min, 15min, 500 μl TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.8, 高压灭菌) 溶解 DNA, 经 DU-50 系列分光光度计测含量为 430 μg。加等体积的双蒸水, 100 μl RNase (10 μg/μl, 煮沸 10min) 37℃ 水浴 30 min, 再次用氯仿-异戊醇萃取, 醋酸钠、乙醇沉淀, 离心。沉淀用 200 μl 双蒸水溶解, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 将含 20 kb 左右的 DNA 大片段胶切出, 进行电洗脱, 洗脱下的 DNA 经沉淀后, 用 200 μl 双蒸水溶解。

2. 水浴脱蜡法 将 66 号石蜡包埋组织切成 5—10 μm 厚的薄片, 置入一烧杯中, 加生理盐水 50ml, 置 65—72℃ 水浴, 待石蜡溶化后, 取出烧杯冷却, 夹去石蜡, 重复 5—10 次, 直至无石蜡为止, 将液体 (含组织) 倒入 Tomy 70ml 离心管中, 离心弃上清, 剪碎组织, 加溶液 A 10 ml, 以后同二甲苯脱蜡法中的操作, 测得 DNA 提取量为 380 μg。

3. 甲醛浸泡胃癌组织的 DNA 提取 将 11873 和 7713 号标本切成薄片, 用不同浓度的乙醇梯度依次水化, 用 SSC 液浸洗一次 (30 min), 弃上清, 以后操作同二甲苯脱蜡法中的操作。测得 11873 和 7713 号标本 DNA 提取量分别为 150 和 100 μg。

六、聚合酶 DNA 链延伸反应

取经电洗脱后 64、66 和 11873 号标本 DNA 各 2 μg, pGC 6.6 DNA 1 μg, 双蒸水 79 μl, PC₁ 和 PC₂ 混合液 (50 μmol/L) 1.5 μl, 2mmol/L dNTPmix (美国 Sigma 产品) 10 μl, 10×R 缓冲液 10 μl (华美公

* 新疆石河子医学院生化教研室, 邮编 832002。

司产品,含 670mmol/L Tris-HCl, pH 8.8, 67mmol/L MgCl₂, 166 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 100 mmol/L 2-巯基乙醇, 1.7 mg/ml BSA, 67 μmol/L EDTA), Taq 酶 2.5U, 液体石蜡 30 μl (华美公司产品)加入 Eppendorf 管内。将此管先后置 94℃、56℃、72℃ 水浴 1、2 和 3min, 重复以上循环 30 次。去石蜡, 水相以等体积氯仿-异戊醇 (24:1) 抽提后加醋酸钠、无水乙醇沉淀 DNA, 再用 20 μl 双蒸水溶解 DNA, 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析。

结果与讨论

一、用二甲苯和水浴法脱蜡从胃癌石蜡包埋块中提取 DNA 效果尚满意, 都有从 4.4 到 23.1kb 的大片段, 产量前者略高于后者。从甲醛浸泡的胃癌组织中提取 DNA, 无论在产量还是分子量大小上远比起从石蜡包埋组织块中提取 DNA 效果要差, 而且浸泡时间越长, DNA 受损越明显。

二、甲醛对 DNA 的影响主要是由于甲醛易氧化成甲酸, 甲酸则对 DNA 有降解作用。因此病理组织在石蜡包埋前, 应尽量缩短甲醛的固定时间。

三、尽管 64 和 66 号胃癌石蜡包埋标本已贮存 10 年, 我们用 pCR 法仍扩增出了 100bp 的片段 (见图 1), 说明只要 DNA 提取、纯化得当, 石蜡包埋组织在分子生物学的研究方面仍有其价值。

四、在 DNA 提取中应注意以下 3 点: (1) 去石蜡要彻底。(2) 减少剧烈振荡以免震碎大片段 DNA。(3) 多增加一些有效措施 (如: 多次沉淀、溶解, 电洗脱等) 纯化 DNA 去除 Taq 酶的干扰剂。

五、由于石蜡包埋的病理组织能得到长期保存, 因

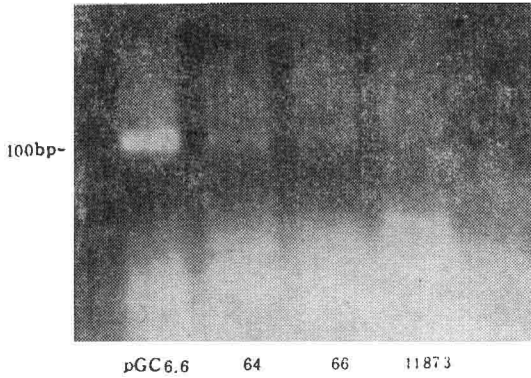


图 1 DNA 的 PCR 扩增图谱

以 pGC 6.6 扩增的 100bp 为阳性对照, 可见 64 (二甲苯脱蜡的组织) 和 66 号 (水浴法脱蜡的组织) 标本均可做出 100bp 的扩增, 甲醛浸泡组织标本 (11873 号) 未见扩增

此本文为能使肿瘤等疾病在基因水平上进行回顾性分析做出了一个良好开端。深入开展这项工作, 将对进一步加强基础理论与临床的配合, 深入探讨疾病的发生、演变及预后关系, 正确评价临床治疗以及加深理解肿瘤生物学特性与临床表现的关系, 有着十分重要的现实意义。

参考文献

1 邓国仁. 生物化学, 1989; 5(6): 481
2 陈世明等. 遗传学报, 1987; 14: 155
3 Dubeau L et al. Cancer Research, 1986; 46: 2965

[本文于 1989 年 11 月 16 日收到,
1990 年 4 月 2 日修回]

《生物化学与生物物理进展》编辑委员会

主 编 林治焕

副主编 马万禄

编 委 (按姓氏笔划为序)

马万禄* 王大成* 王庆诚 申同健* 李 钦
曲善乐 寿天德 何润根 陈 燕 陈润生*
范培昌 林克椿* 林治焕* 周筠梅* 张少吾
赵敏顺 俞贤明 陶宗晋 姚志建 徐森根
曹恩华 黄祚强 雷克健* (带*者为常务编委)

顾 问 贝时璋 邹承鲁 沈淑敏 梁栋材 杨福愉